

## 植物叶片内生放线菌的分离、分类与拮抗活性

古 强<sup>1,2</sup> 刘 宁<sup>1,2</sup> 邱旦恒<sup>1,2</sup> 刘志恒<sup>1</sup> 黄 英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘 要** :以四川采集的芍药和北京采集的三叶草的叶片为材料,经表面消毒程序后,分离出内生放线菌 15 株。通过表观特征比较和 BOX-PCR 基因指纹图谱分析的方法,将分离出的放线菌归并于 12 个不同的基因型,其中 6 个来自芍药,6 个来自三叶草。结合 16S rRNA 基因序列分析可知,分离菌株除 C4、C5 属于假诺卡氏菌外,其余的 13 株都是链霉菌,菌株 C12 与最近模式种的 16S rRNA 基因序列相似性较低,为 96.6%。对分离菌株的抗菌活性实验表明,有 11 株在一个或一个以上的测试中呈阳性,其中 6 株对植物致病菌立枯丝核菌有明显抗性,占阳性菌株的 55%。

**关键词** :内生放线菌;分离;BOX-PCR;分类;拮抗活性

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)05-0778-05

植物内生菌(Endophytes)是指生长于健康植物组织内部,对植物不引起可见病症的微生物<sup>[1,2]</sup>,包括真菌、放线菌和其它细菌等。植物内生放线菌在植物体内的作用多样,可能为宿主提供保护,抵御外来其它微生物的侵害<sup>[3,4]</sup>;也可能与宿主有着共进化的关系,共同产生一些有用的活性物质<sup>[3,5]</sup>。近年来,人们开展大量有关植物内生放线菌的研究,Coombs 等<sup>[6]</sup>从小麦的根部分离出多个新的放线菌分类单元;Strobel 等<sup>[5]</sup>从蛇纹树中找到了产生新抗生素 Munumbicins 的链霉菌,我国的曹理想等<sup>[1]</sup>也开展了内生放线菌在生物防治方面的研究。

植物的叶片作为一个特殊的生境,通常暴露于空气中,远离放线菌的大本营——土壤,其中的内生放线菌可能与宿主存在着更为密切的联系。Okazaki 等<sup>[7]</sup>对日本境内植物叶片中的放线菌进行了研究,并从分离出的放线菌中找到了 3 种新抗生素。我国幅员辽阔,植物种类繁多,为研究植物叶片内生放线菌提供了丰富的材料。本文采集四川的芍药(*Paeonia lactiflora*)和北京的三叶草(*Trifolium repens*)的叶片作为样品,分离其内生放线菌,并分析了分离菌株的多样性和抗菌活性,以期为进一步探讨我国植物叶片内生放线菌的利用与开发提供可靠方法和指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品的分离** 2004 年 10 月,分别在四川自贡采集芍药(*Paeonia lactiflora*)的叶片和在北京采集三叶草(*Trifolium repens*)的叶片。采集的样品置于 4℃ 保藏,并尽快进行内生放线菌的分离。

**1.1.2 培养基和主要试剂** :分离培养基:自来水酵母粉琼脂(TWYE)<sup>[6]</sup>、腐植酸维生素琼脂(HV)<sup>[6,8]</sup>、酵母酪素琼脂(YECD)<sup>[6]</sup>、1/10 营养琼脂(NA)<sup>[9]</sup>和水琼脂(WA)<sup>[9]</sup>。除 WA 外,其余培养基均补充放线菌酮和制霉菌素各 50 μg/mL。PCR 试剂购于上海申能博彩生物科技有限公司。

**1.1.3 测试菌株** :抗菌活性的测试菌株:耐药大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)来自潍坊医学院;烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、尖孢镰孢霉(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和浅黄分支杆菌(*Mycobacterium gilvum*)来自中国普通微生物保藏中心(CGMCC)。

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62553628; E-mail: huangy@im.ac.cn

作者简介:古强(1981-),男,四川富顺人,硕士研究生,主要从事放线菌分类学研究。

其他作者:柯亮<sup>1</sup>

收稿日期:2005-11-24;接受日期:2005-12-20;修回日期:2006-04-25

## 1.2 内生放线菌的分离与纯化

按照 Coombs<sup>[6]</sup> 的方法进行植物叶片的表面消毒,使用无菌刀将消毒好的叶片切成 1cm × 1cm 左右的小块,贴在分离培养基表面。同时,将最后一次处理植物样品的清洗液涂在 ISP 2<sup>[10]</sup> 培养基上,用以检查表面消毒的效果。分离培养基置于 27℃、湿润的环境中培养 2~6 周,以待放线菌的长出。

在显微镜的帮助下,将叶片周围长出的放线菌转移到干净的 ISP 2 培养基上,并反复划线纯化。一些不易纯化的菌株可采用稀释涂板的方法进行操作,具体如下:将混杂的放线菌菌落挑到 5mL 的 ISP 2 液体培养基中,振荡培养 2~3d 后,分别按 1:10、1:100、1:1000 的浓度进行稀释(稀释浓度随菌的不同有所变化),再将稀释的培养液分别涂布到 ISP 2 平板上。

## 1.3 表面消毒可靠性的检验

选择不同的链霉菌 3 株、诺卡氏菌 2 株、芽孢杆菌 1 株和其它细菌 1 株,混合制成孢子(或菌)悬液,并均匀地分为两份。其中一份严格按照表面消毒的步骤逐一处理;另一份作对照,消毒流程不变,只是将各种消毒液换成无菌水。最后,将两份处理后的孢子(或菌)悬液稀释涂布平板,检查消毒的效果。

## 1.4 形态及培养特征观察

使用 ISP 2 培养基进行插片观察。显微镜观察形态,肉眼观察培养特征,记录气丝、基丝、色素和孢子丝吸水情况<sup>[11]</sup>。

## 1.5 基因组 DNA 的提取及 BOX-PCR 基因指纹图谱分析

采用 Chun 等<sup>[12]</sup> 的方法进行基因组 DNA 的提取。

对培养特征相似的菌株按照 Lanoot 等<sup>[13]</sup> 的方法进行 BOX-PCR 指纹图谱分析,将菌株归并为不同的基因型。

## 1.6 16S rRNA 基因序列及系统发育分析

选择不同基因型或表现形态差异明显的菌株进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增<sup>[14]</sup> 和测序<sup>[15]</sup>。测得的序列提交 GenBank 注册,注册序列号为 DQ490988-DQ490999(详见图 2)。将各分离菌株的 16S rRNA 基因序列送到 NCBI 进行 Blast 比对,把分离株及其在 GenBank 中相近的模式菌的 16S rRNA 基因序列一并调入 MEGA<sup>[16]</sup> 中做进化分析。首先使用 Clustal W 进行多序列比对;然后按照 Kimura 2-parameter 计算进化距离,最后构建 Neighbour-Joining (NJ) 系统发育树,选择 1000 个重复做 Bootstrap 值分析。

## 1.7 抗菌活性测试

采用琼脂移块的方法<sup>[17]</sup> 进行测试。

## 2 结果

### 2.1 表面消毒的可靠性

在检查表面消毒可靠性的实验中,经过消毒程序处理的孢子(或菌)悬液在平板上只有零星的芽孢杆菌长出,而在对照的平板上,放线菌的生长占据优势。此外,在用最后一次处理植物样品的清洗液涂布的平板上,也看不到有放线菌菌落的长出。由此可以看出,一般放线菌在经过我们的表面消毒程序后不能存活,尽管芽孢杆菌表现出一定的耐受性,但是它对内生放线菌的分离不造成影响。

### 2.2 分离菌株的多样性

在显微镜的帮助下,从分离培养基上挑出放线菌菌落,经过纯化,得到放线菌 15 株。其中芍药叶片 8 株,编号为 B1~B8;三叶草叶片 7 株,编号为 C1~C5、C11 和 C12。

通过比较发现,菌株 B1 与 B7、B2、B3 与 B4、B5 与 B6 以及 C4 与 C5 在培养特征上各自相似,这些菌株被选择出来做进一步的 BOX-PCR 指纹图谱分析,结果见图 1。从该图可以看出,B1 与 B7、B3 与 B4 还有 C4 与 C5 分别呈现了相同的指纹图谱带型,应分别归为相同的基因型;而其余菌株的带型各不相同,代表了不同的基因型。

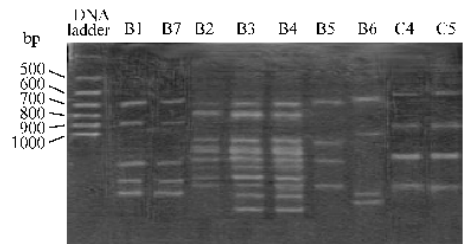


图 1 BOX-PCR 指纹图谱分析

Fig. 1 BOX-PCR fingerprinting patterns of isolates.

对除 B1、B3、C4 外的所有分离株进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序。16S rRNA 基因序列分析的结果和表现形态的观察均支持:分离株 C4 和 C5 属于假诺卡氏菌,其余的 13 株菌属于链霉菌,链霉菌是所分离植物叶片中的优势放线菌群。在 NCBI 的 Blast 比对中,C12 与所有模式菌中的 *S. olivoreticuli* subsp. *olivoreticuli* LMG 20050T 最近,而相似性只有 96.6%,可能是一个潜在的新种;其余菌株与相应模式菌的相似性均在 97.5% 以上。

图 2 是根据 16S rRNA 基因序列构建的 N-I 系

统发育树。如图, B2和B4都与 *Streptomyces albus* 亲缘关系相近, 相似性分别是 99.2% 和 100%; B5和B6都与 *S. roseolus* 相近, 相似性分别是 98.5% 和 99.4%; 其余菌株, B7与 *S. canus* (100%), B8与 *S. griseinus* (98.1%), C1与 *S. bungoensis* (99.6%), C2与 *S. cirratus* (99.8%), C3与 *S. cinnamonensis*

(100%) 和 C11与 *S. celluloflavus* (100%) 分别相近; 此外, C5与 *Pseudonocardia antarctica* 和 *P. kongjuensis* 的相似性分别为 97.5% 和 97.9%; C12与 *S. olivoreticuli* subsp. *Olivoreticuli* 和 *S. parvisporogenes* 的相似性分别为 96.6% 和 96.4%。B2和B4之间的相似性为 99.2%; B5和B6之间为 98.7%。

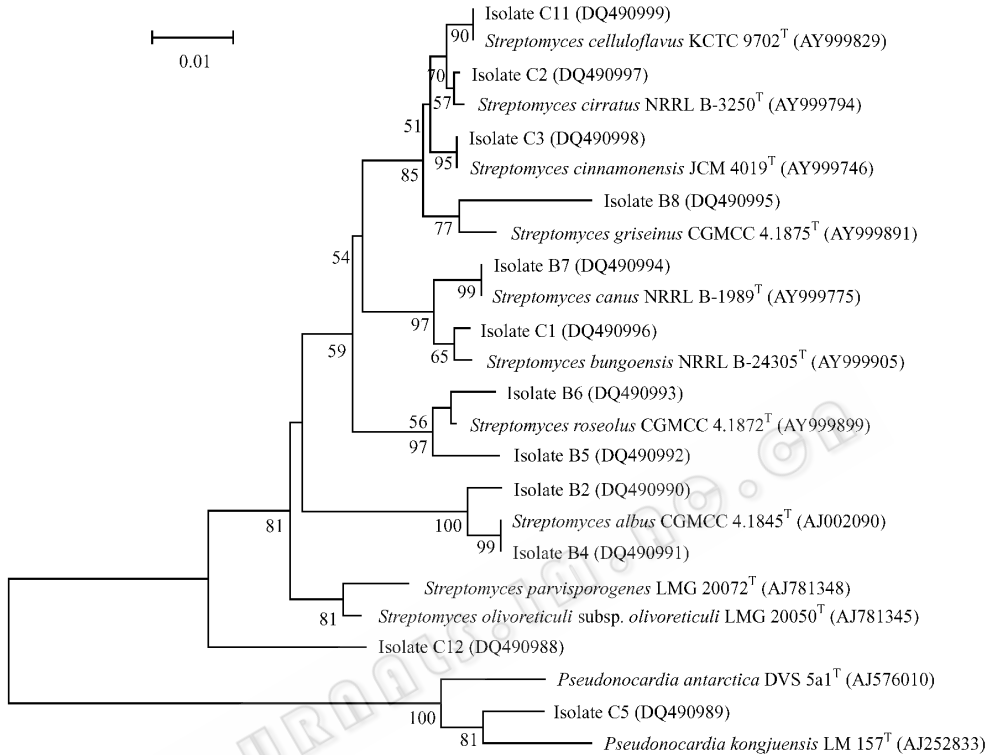


图2 分离菌株的系统发育 N-J 树

Fig.2 Phylogenetic N-J tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of isolates. Bootstrap values (%) above 50% are shown at the nodes. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 2.3 分离菌株的抗菌活性

对分离菌株进行抗菌活性实验表明(表1),除 B7、B8、C4、C5 这 4 株菌外,其余的 11 株均表现出不同程度的抗菌活性。在具有拮抗活性的分离株中,以 C2 的抗菌谱最广,对表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆

菌、白色念珠菌和立枯丝核菌的拮抗均呈阳性;此外,共有 6 株分离菌株拮抗立枯丝核菌,占阳性菌株的 55%。但所有菌株均不拮抗绿脓杆菌、肺炎克雷伯氏菌、尖孢镰孢霉和浅黄分支杆菌。

表1 分离菌株的抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activity tests of isolates

Strain No.	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
B1	-	++	-	+	-	-	-
B2	-	-	+	-	+	-	++
B3	-	-	-	-	+	-	++
B4	-	-	-	-	-	-	++
B5	+	-	-	-	-	-	-
B6	++	-	-	-	-	-	-
B7	+	-	-	-	-	-	-
C1	-	-	++	-	-	-	-
C2	-	+	-	+	+	-	++
C3	+	-	-	-	-	-	++
C11	-	-	-	-	-	++	-
C12	-	-	-	-	-	-	++

### 3 讨论

从植物叶片中分离放线菌,表面消毒是一个关键的步骤。叶片的表面附着有大量快生型的真菌,培养时可能快速布满整个平板,不利于放线菌的分离;其次,叶片上通常有很多小虫,比如螨等,这些虫子往往会吃掉生长出来的放线菌菌落<sup>[7]</sup>。次氯酸钠和酒精作为表面消毒剂已经广泛用于分离植物内生菌<sup>[2]</sup>。实验表明,我们采用的消毒方法能有效去除表面杂菌的污染,从叶片中分离出内生放线菌。

虽然次氯酸钠是一种广泛使用的杀菌剂,但其杀菌机理还不十分清楚。一般认为,在次氯酸钠的水溶液中,HClO 是其主要的活性成分,它可与细胞表面的  $\text{NH}_4^+$  反应生成氯胺,而后者是一种稳定的水溶性物质。研究表明,HClO 和氯胺都能对 DNA 形成致死性的伤害,但是由于前者的不稳定性,真正起到杀菌作用是氯胺<sup>[18,19]</sup>。在使用次氯酸钠溶液处理植物组织后,须用无菌水进行反复的清洗,尽量避免残留的氯胺对放线菌的影响。反复的清洗还有利于冲掉叶片表面残留的耐受孢子,比如芽孢杆菌的孢子。

本次实验只分离出 15 株放线菌,这可能与我们的采样量有关系。事实上,我们分离内生放线菌的出菌率(2%~10%,分离出的放线菌株数与植物样品数的比例)与 Taechowisan 等<sup>[20]</sup>的报道是相当的。在分离的 15 株菌中,13 株都是链霉菌,证明植物叶片中的内生放线菌以链霉菌为主,这也与国内外的报道一致<sup>[1,7,20]</sup>。此外,Coombs 等<sup>[6]</sup>在报道中指出,营养贫瘠的 TWYE 等培养基更适合用以分离内生放线菌,这种现象也在我们的实验中得到重现,大部分的分离株都能单独从 TWYE 分离得到。

目前,放线菌侵染植物叶片的机理还不是十分清楚。内生放线菌在植物叶片中的作用也是复杂多样的,有些菌可以帮助宿主吸收营养成分,有些菌可以帮助宿主抵御病虫害的侵袭<sup>[3]</sup>。在我们的抗菌实验中,40%的分离株对植物病原菌立枯丝核菌有拮抗活性,显示了较强的生物防治的价值。此外,有报道表明<sup>[3]</sup>从某些药用植物中分离的放线菌显示出特殊的用途,该种植物药效的产生可能与其内生放线菌有关,甚至就是由其内生放线菌产生的。

在我们的实验中,从四川芍药叶片和北京三叶草叶片中分离的内生放线菌各不相同。通常认为,植物体内的内生放线菌会因为植物种类、地域分布的不同而不同,也就是说,植物种类和分布的多样性

决定了植物内生放线菌的多样性<sup>[3]</sup>。我国有着丰富的植物多样性,尤其是民族药用植物,以及广阔的地域分布,因而在我国开展植物内生放线菌的研究有着巨大的潜力。

致谢 本研究受到浙江海正药业的资助,并得到云南大学教育部微生物资源重点实验室的协作,在此一并表示感谢!感谢潍坊医学院赵乃昕教授提供耐药细菌测试菌。

### 参 考 文 献

- [1] 曹理想,田新莉,周世宁. 香蕉内生真菌、放线菌种群分析. 中山大学学报, 2003, 42(2): 70-73.
- [2] Bacon CW, White JF. Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- [3] Strobel GA. Endophyte as sources of bioactive products. *Microbes Infect*, 2003, 5: 535-544.
- [4] Shimizu M, Furumai T, Igarashi Y, et al. Association of induced disease resistance of Rhododendron seedlings with inoculation of *Streptomyces* sp. R-5 and treatment with Actinomycete D and Amphotericin B to the tissue-culture medium. *J Antibiot*, 2001, 54: 510-505.
- [5] Castillo U, Strobel GA, Ford EJ, et al. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces munumbi*, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiol*, 148: 2675-2685.
- [6] Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 5603-5608.
- [7] Okazaki T. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. In: Kurtboke I ed. Selective isolation of actinomycetes. Nambour, Queensland: Queensland complete printing services, 2003.
- [8] Hayakawa MT, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new method for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Bioeng*, 1987, 65: 501-509.
- [9] Castillo U, Giles S, Strobel GA, et al. Scanning electron microscopy of some endophytic streptomycetes in snakevine-*Kennedia nigricans*. *Scanning*, 2005, 27: 73-73.
- [10] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16: 313-340.
- [11] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975.
- [12] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequence. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45: 240-245.
- [13] Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P, et al. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions of the species *Streptomyces cinereotectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeoauripureus*. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27: 84-92.

- [ 14 ] Huang Y , Qi W , Lu Z , et al . *Amycolatopsis rubida* sp. nov. , a new *Amycolatopsis* species from soil . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2001 , **51** : 1093 – 1097 .
- [ 15 ] Lu Z , Liu Z , Wang L , et al . *Saccharopolyspora flava* sp. Nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov. , novel actinomycetes from soil . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2001 , **51** : 319 – 325 .
- [ 16 ] Kumar S , Tamura K , Nei M . MEGA3 : Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment . *Brief Bioinform* , 2004 , **5** : 150 – 163 .
- [ 17 ] 罗红丽 , 黄 英 , 王黎明 , 等 . 西藏地区土壤放线菌种群多样性及拮抗活性研究 . *微生物学报* , 2005 **45** ( 5 ) : 724 – 727 .
- [ 18 ] Miche L , Balandreau J . Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on Inoculated *Burkholderia vietnamiensis* . *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** : 3046 – 3052 .
- [ 19 ] Dukan S , Belkin S , Touati D . Reactive oxygen species are partially involved in the bactericidal action of hypochlorous acid . *Arch Biochem Biophys* , 1999 , **367** : 311 – 316 .
- [ 20 ] Taechowisan T , Peberdy JF , Lumyong S . Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity . *World J Microb Biot* , 2003 , **19** : 381 – 385 .

## Isolation , classification and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes from plant leaves

GU Qiang<sup>1,2</sup> , LIU Ning<sup>1,2</sup> , QIU Dan-heng<sup>1,2</sup> , LIU Zhi-heng<sup>1</sup> , HUANG Ying<sup>1\*</sup>

( <sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

( <sup>2</sup> Department of Biology , Graduate University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China )

**Abstract** : Leave samples of *Paeonia lactiflora* and *Trifolium repens* were collected from Sichuan Province and Beijing respectively to study their endophytic actinomycetes . After a well-established surface-sterilized procedure , the samples were plated on agar media of TWYE , HV , YECD , NA and WA , followed by incubation at 28°C for 2 ~ 4 weeks . With the help of light microscope , 15 actinomycetes strains were isolated from the plates . Comparison of cultural features and fingerprinting analyses of BOX-PCR products were performed to cluster the isolates , with the result that all the strains were assigned to 12 different genotypes , half of them from *Paeonia lactiflora* and half from *Trifolium repens* . A combination of morphological and 16S rRNA gene sequence data showed that except strains C4 and C5 , which belonged to *Pseudonocardia* , 13 of the isolates were streptomycetes . Most isolates share high 16S rRNA gene sequence similarities to known type strains . However , strain C12 shares low values , 96.6% in maximum , and strain C5 shares 97.9% in maximum ; more assays are needed to ascertain their taxonomic positions . In the tests of antimicrobial activity against 7 bacteria , 3 fungi and 1 yeast , 11 isolates were positive in one or more tests , and 55% of the positive ones could inhibit the growth of *Rhizoctonia solani* , a significant pathogen of plants .

**Keywords** : Endophytic actinomycetes ; Isolation ; BOX-PCR ; Classification ; Antimicrobial activity

\* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-62553628 ; E-mail : huangy@im.ac.cn

Other author : HE Liang<sup>1</sup>

Received : 24 November 2005 / Accepted : 20 December 2005 / Revised : 25 April 2006